(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월14일
(11) 등록번호 10-1837622
(24) 등록일자 2018년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 65/08 (2009.01) *B01D 11/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 65/08 (2013.01)
B01D 11/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0089280
(22) 출원일자 2016년07월14일
심사청구일자 2016년07월14일
(65) 공개번호 10-2018-0008960
(43) 공개일자 2018년01월25일
(56) 선행기술조사문헌
Korean J. Medicinal Crop Sci., Vol. 22(4), pp. 289-294, 2014.

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
대한민국(환경부 국립생물자원관장)
인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물자원관 (경서동)
(72) 발명자
최경자
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 208-1403
장경수
대전광역시 유성구 장대동 74번길 34 대우푸르지오@ 107동 1003호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 **빌레나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 이를 이용한 식물병 방제 방법**

(57) 요 약

본 발명은 빌레나무(*Maesa japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 이를 이용한 식물병 방제방법을 제공하기 위한 것으로, 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 천연물로부터 유래하여 인체에 무해하고 환경오염을 유발하지 않으면서 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 밀 붉은녹병, 토마토 역병 또는 토마토 잿빛곰팡이병 등의 식물진균병에 대한 방제활성을 나타내므로 환경친화적인 천연물 살균제의 개발 및 고부가가치의 유기농산물 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류
Y10S 424/10 (2013.01)
Y10S 514/918 (2013.01)
(72) 발명자
최용호
대전광역시 유성구 가정로 63, 105동 801호
김헌
경기도 성남시 분당구 황새울로 54, 320-102
한재우
대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원 인재관 405호
윤성건
인천광역시 남동구 만수서로105번길 40-18 1103동 1202호 (만수동,주공아파트)
김수영
경기도 김포시 유현로 51 201동 704호 (풍무동,유현마을현대프라임빌아파트)
김은실
서울특별시 광진구 뚝섬로47길 36 301호 (자양동, 서림골든맨숀)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 KK1606-M02
부처명 한국화학연구원
연구관리전문기관 한국화학연구원
연구사업명 기관고유사업
연구과제명 글로벌 작물보호제 개발을 위한 식물유래 선도물질 탐색(2)
기 여 율 70/100
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 SI1608
부처명 기획예산처
연구관리전문기관 한국화학연구원
연구사업명 정부출연 일반사업
연구과제명 시장선도형 작물보호제 선도소재개발
기 여 율 30/100
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

빌레나무(*Maesa japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병 및 고추 탄저병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 식물병 방제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C_1 내지 C_4 저급 알코올, n-헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 아세톤 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올, 메탄올, 프로판올 또는 부탄올인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 분획물은 빌레나무 추출물을 유기용매를 이용하여 분획한 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 유기용매는 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate) 또는 n-부탄올(butanol)인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 분획물은 빌레나무 추출물을 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), n-부탄올(butanol) 및 물 순으로 계통분획하여 얻은 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 보트라이티스 시네리아(*Botrytis cinerea*), 알터나리아 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 콜레토트리쿰 프럭티콜라(*Colletotrichum fructicola*), 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*), 마그나포르테 오라이제(*Magnaporthe oryzae*), 파이토프토라 인페스탄스(*Phytophthora infestans*), 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*) 및 스클레로티니아 스클레로티오럼(*Sclerotinia sclerotiorum*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 식물 병원성 곰팡이 균사 생장을 억제하는 것

을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 아그로박테리움 튜메파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*), 버크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*) 및 펙토박테리움 카로토보럼(*Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 식물 병원성 세균 생장을 억제하는 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 추출물 또는 이의 분획물은 식물병 방제용 조성물에 100 내지 3,000 ㎍/㎖ 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 빌레나무(*Maesa japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 하는 환경친화적인 식물병 방제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 20세기 후반 미국의 식물병리학자 볼로그는 교잡종자, 합성농약, 합성살균제로 대표되는 현대농법을 발전시켰다. 이를 '녹색혁명'이라 부르며, 현대농업에서 농약의 사용은 수확량을 보전하는데 필수적이게 되었다. 작물 생산에 있어 각종 식물병원균, 해충 및 잡초가 작물의 생육을 저해하고, 적절한 방제를 실시하지 않을 경우 재배하는 작물의 종류에 따라서 30~100%의 수확량 감소가 일어난다. 지금까지 다양한 종류의 합성농약들이 개발되고 작물보호에 적극적으로 이용되어 왔지만, 다년간의 합성농약사용으로 인해 약제에 저항성이 생긴 유해생물의 출현빈도가 증가하고 있고, 오남용된 농약의 잔류독성에 의한 인체 건강과 환경오염 및 생태계 교란에 대한 우려가 커지고 있어, 우리나라를 포함한 OECD 가입국을 중심으로 합성농약 사용에 대한 정책적인 규제가 강화되고 있다. 미국화학협회의 화학정보데이터베이스(CAS)에 등록된 수백만 종의 화합물을 군집분석하면 단 몇 백 종의 선도물질 군으로 분류할 수 있는데, 선도물질을 기준으로 규제가 강화되면, 앞으로 사용할 수 있는 합성농약의 수는 급감하게 될 수밖에 없다. 합성농약 사용을 감축하고자 하는 친환경농업정책과 더불어 새로운 친환경적인 방제 수단에 대한 수요가 증가하고 있어, 생물농약이 합성농약의 대안으로 떠오르고 있다.

[0003] 생물농약은 합성농약과 달리 인축 및 생태계에 미치는 영향이 적은 환경친화적인 작물보호제로서, 유기농산물과 같이 부가가치가 높은 농산물을 생산하는데 이용할 수 있고, 합성농약으로 방제가 어려운 병해충을 효과적으로 방제하는데 이용될 수 있다. 생물농약에는 미생물의 기능을 활용하는 미생물농약과 식물이나 미생물에서 유래한 대사물질을 활용하는 생화학농약이 있다. 세계 농약의 20%를 생물농약(biopesticide)으로 대체하자는 '리우환경회의 협약' 이후 친환경 천연물 농약, 특히 식물 추출물을 이용한 농약 개발이 주목을 받고 있다. 2011년 13억 달러였던 생물농약 시장도 연평균 16% 정도 성장해 오는 2017년에는 32억 달러에 달할 전망이다. 우리 정부도 친환경농업정책에 힘을 쏟고 있고, 친환경 농산물에 대한 국민 인식도 높아져 있어 현재 정부출연연구소와 대학, 그리고 몇몇 중소벤처 기업체에서 개별적으로 진행되고 있는 생물농약에 대한 연구도 보다 활기를 띨 것으로 전망한다. 학술지 엘스비어(Elsevier)의 데이터베이스에서 얻은 친환경 천연물 농약 관련 논문 3236편(1996-2013년)을 분석한 결과, 연평균증가율 12%로 논문 수가 증가하여 바이오농약에 대한 관심이 꾸준히 증가하고 있는 것으로 나타났다.

[0004] 우리나라는 농촌진흥청에서 친환경농업에 사용되는 병해충 방제용 생물농약의 등록과 관리를 주관하며, '친환경유기농자재 목록'을 공시하여 친환경 유기농업에 사용할 수 있는 제제의 정보를 제공하고 있다. 2016년 3월 기준으로 총 427종이 병해충 방제용 생물농약으로 공시되어 있고, 이 가운데 식물 추출물이 204종, 미생물추출물 10종, 미생물제제 62종으로 유기농업에 사용할 수 있는 제제의 약 48%가 식물 추출물을 이용했다.

[0005] 빌레나무(*Maesa japonica*)(Thunb) Morizi & Zoll.는 분류학적으로 앵초목(Primulales) 빌레나무과(Maesaceae)에 속하는 상록 덩굴성 떨기나무이다. 본 종은 제주도에서 채집되어 2006년에 국내 미기록종으로 발표되었다. 빌레나무과는 빌레나무속(Maesa) 1속으로 구성되며, 꽃자루에 1쌍의 소포엽이 있고, 가웅예가 없으며, 다수의 종자가 있는 폐과로서 자금우과(Myrsinaceae) 및 앵초과(Primulaceae)와 구분된다. 줄기는 곧게 자라며, 높이 1~1.5 m이다. 가지를 치며 땅에 닿는 마디에서 뿌리가 나온다. 잎은 마주나며, 타원형 또는 긴 타원형, 길이 5~17 ㎝, 폭 2~5 ㎝이다. 잎 뒷면은 회녹색이다. 꽃은 4~5월에 피며, 잎겨드랑이에서 나온 총상꽃차례에 달린다. 꽃받침은 5갈래로 갈라지며, 꽃받침잎은 둔한 삼각형이다. 수술은 5개, 암술은 1개이다. 열매는 장과로 둥글다. 국내뿐만이 아니라 대만, 베트남, 일본, 중국에 분포한다.

[0006] 중국전통의학에서는 잎과 뿌리가 일반적인 감기 증상을 치료한다고 알려졌으며, 메사 속(*Maesa* spp.)에 속하는 다른 종은 아프리카와 아시아 국가에서 민간요법에 사용되어왔다. 메사 란세올라타(*Maesa lanceolata*)는 아프리카 르완다의 전통의학에서 간염, 이질, 피부병, 신경병 치료에 사용되었고, 이 식물이 동아프리카에서는 콜레라(cholera)를 예방하는 민간요법에 사용되었다. 메사 발란세(*Maesa balansae*)는 베트남 전통의학에서는 알러지, 염좌, 기생충감염, 피부궤양, 숙취, 두통의 치료제로 사용되었다. 메사 란세올라타(*Maesa lanceolata*)의 잎에서 분리된 메사사포닌(maesasaponins)은 항바이러스, 항연체동물, 용혈작용, 혈관형성억제 등 다양한 생리활성을 나타냈으며, 이 식물의 열매에서 분리된 메사닌(maesanin) 및 메사퀴논(maesaquinone)은 면역증강 및 항암활성을 나타냈다. 메사 발란세(*Maesa balansae*)의 잎에서 분리된 메사발라이드(maesabalides)는 항리슈만편모충(antileishmania) 활성을 나타냈다. 빌레나무(*Maesa japonica*)의 나무껍질, 뿌리, 열매에서 메사퀴논(maesaquinone) 및 아세틸메사퀴논(acetylmaesaquinone)이 분리되었고, 잎에서는 메사사포닌(maesasaponins)의 일종인 메자포사이드(maejaposides)가 분리된 바 있다. 빌레나무(*Maesa japonica*) 잎추출물의 n-부탄올 분획물에서 MRC-5에 대한 세포독성 및 항리슈만편모충 활성이 보고된 바 있고, 빌레나무의 잎·줄기 및 꽃 추출물이 피부노화방지에 효과가 있는 화장품 원료로서 미국특허(US8709507 B2)로 등록된 바가 있다. 그러나 빌레나무 추출물의 식물병 방제활성에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다.

[0007] 식물 추출물은 다양한 생리활성을 나타내어 전통의학 및 민간요법을 통해 다양한 분야에서 이용되어 왔다. 이에 근거하여 본 발명자들은 환경친화적인 식물병 방제 수단으로서 식물 추출물을 이용하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 인체에 무해하고 환경오염을 유발하지 않으면서 벼 도열병(*Magnaporthe oryzae*), 벼 잎집무늬마름병(*Rhizoctonia solani*), 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 토마토 역병(*Phytophthora infestans*), 밀 붉은녹병(*Puccinia recondita*) 및 고추 탄저병(*Colletotrichum coccodes*) 등 작물생산에 있어 중요한 식물병에 대해 우수한 방제 효과를 나타내는 빌레나무(*Maesa japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 이의 식물병 방제방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 해결하기 위해, 본 발명은 빌레나무(*Maesa japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 빌레나무(*Maesa japonica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 이의 식물병 방제 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 식물병 방제용 조성물은 천연물로서 인체에 무해하고 자연계에서 생분해되어 환경부하가 적으면서 벼 도열병(*Magnaporthe oryzae*), 벼 잎집무늬마름병(*Rhizoctonia solani*), 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 토마토 역병(*Phytophthora infestans*), 밀 붉은녹병(*Puccinia recondita*) 및 고추 탄저병(*Colletotrichum coccodes*) 등 식물진균병에 대한 방제활성을 나타내므로 환경친화적인 생물농약으로 개발될 수 있고 고부가가치의 유기농산물 생산에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 빌레나무(*Maesa japonica*) 전초의 에탄올추출물(3,000 ppm)의 벼 도열병에 대한 방제효과를 나타낸 결과이다:

왼쪽은 무처리 대조구; 중간은 빌레나무 추출물; 및 오른쪽은 합성살균제 트리사이클라졸(tricyclazole 10 ppm) 처리구.

도 2는 빌레나무(*Maesa japonica*)의 에틸아세테이트추출물(900 ㎍) 및 n-부탄올 추출물(900 ㎍)의 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae*)에 대한 in vitro 항균 활성을 페이퍼디스크 한천배지확산법으로 평가한 결과이다.

도 3은 빌레나무(*Maesa japonica*) 잎·줄기메탄올 추출물의 에틸아세테이트층으로부터 분리한 분획물 E222241을 고성능액체크로마토그래피를 사용하여 280 ㎚ 파장에서 검출한 크로마토그램 및 분석된 피크의 UV 흡광스펙트럼과 항균활성을 나타낸 결과이다.

도 4는 빌레나무(*Maesa japonica*) 잎·줄기 메탄올 추출물의 n-부탄올층으로부터 분리한 분획물 B944를 고성능액체크로마토그래피를 사용하여 230 ㎚ 파장에서 검출한 크로마토그램 및 분석된 피크의 UV 흡광스펙트럼과 항균활성을 나타낸 결과이다.

도 5는 빌레나무(*Maesa japonica*) 잎·줄기 메탄올 추출물의 n-부탄올층으로부터 분리한 분획물 B9453을 고성능액체크로마토그래피를 사용하여 210㎚ 파장에서 검출한 크로마토그램 및 분석된 피크의 UV 흡광스펙트럼과 항균활성을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 명세서 중에서 “방제”라고 하는 것은 병이나 해충의 예방, 기피 뿐만 아니라 제거, 사멸을 포함하는 의미로 이용하는 것으로 한다. 하지만 식물병 방제는 예방적 처리에 의한 방제효과가 주요 방제 기작이므로 빌레나무 추출물 및 분획물의 식물병에 대한 방제효과 조사는 예방적 처리로 실험하였다.

[0013] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0014] 본 발명은 빌레나무(Maesa japonica) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 빌레나무 추출물 또는 이의 분획물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0016] 1) 빌레나무에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0017] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

[0018] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 빌레나무의 추출물을 제조하는 단계; 및

[0019] 4) 단계 3)의 빌레나무 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 빌레나무 분획물을 제조하는 단계.

[0020] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 빌레나무는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 빌레나무는 잎, 줄기 또는 뿌리가 모두 이용가능하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 빌레나무의 채취 시기는 9월인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0021] 상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올, n-헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 아세톤 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0022] 상기 알코올로는 C_1 내지 C_4 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올, 메탄올, 프로판올 또는 부탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 빌레나무 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 2 내지 3배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃인 것이 바람직하고, 20℃ 내지 40℃인 것이 더욱 바람직하고, 실온인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하고, 24시간인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0024] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 유기용매는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, n-부탄올 또는 물인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 빌레나무 추출물을 물에 현탁시킨 후 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 또는 물 분획물 중 어느 하나인 것이 바람직하며, 에틸아세테이트 분획물 또는 n-부탄올 분획물임이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 상기 빌레나무 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0025] 상기 식물병은 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병 및 고추 탄저병으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 식물병인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0026] 상기 조성물은 보트라이티스 시네리아(*Botrytis cinerea*), 알터나리아 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 콜레토트리쿰 프럭티콜라(*Colletotrichum fructicola*), 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*), 마그나포르테 오라이제(*Magnaporthe oryzae*), 파이토프토라 인페스탄스(*Phytophthora infestans*), 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*) 및 스클레로티니아 스클레로티오럼(*Sclerotinia sclerotiorum*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 식물 병원성 곰팡이 균사 생장을 억제하는 것이 바람직하며, 아그로박테리움 튜메파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*), 버크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*) 및 펙토박테리움 카로토보럼(*Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 식물 병원성 세균 생장을 억제하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0027] 상기 추출물 또는 이의 분획물은 식물병 방제용 조성물에 100 내지 3,000 ㎍/㎖ 농도로 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 1,000 내지 3,000 ㎍/㎖ 농도로 포함되는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0028] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 빌레나무 추출물의 7가지 식물병에 대한 방제활성을 확인한 결과 빌레나무 전초에서 70% 에탄올수용액으로 수득한 추출물은 3,000 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 보리 흰가루병을 제외한 나머지 6종의 식물병에 대한 방제활성을 나타내었으며 특히, 벼 도열병, 밀 붉은녹병, 고추 탄저병에 대하여는 방제가 80% 이상의 강한 방제 활성이 나타냈다(표 1 및 도 1 참조).

[0029] 또한, 빌레나무 부위별 추출물의 7가지 식물병에 대한 방제활성을 확인한 결과, 빌레나무의 잎·줄기추출물 또는 뿌리추출물 용액을 3,000 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 밀 붉은녹병에 대하여 방제가 73% 이상의 높은 방제 효과를 나타냈고, 잎·줄기추출물의 경우 고추 탄저병에 대하여 방제가 50%의 방제활성을 나타냈다. 1,000 ㎍/㎖ 농도에서도 두 가지 종류의 추출물은 벼 도열병에 대하여 80% 이상의 높은 방제가를 나타냈고, 벼 잎집무늬마름병균, 밀 붉은녹병에 대해서는 50~60%의 방제가를 나타냈다(표 2 참조).

[0030] 또한, 시기별로 채취한 빌레나무의 전초추출물을 3,000 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 채취시기에 관계없이 벼 도열병에 대하여 방제가 98%의 높은 방제활성을 나타냈고 9월에 채취한 시료는 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 고추 탄저병에 대하여 방제 활성이 다른 시기와 비교해서 다소 높은 방제 효과를 나타냈다(표 3 참조).

[0031] 또한, 빌레나무 잎·줄기추출물의 8가지 식물병원균에 대한 균사생장 억제활성을 확인한 결과 빌레나무 잎·줄기추출물을 333 ㎍/㎖ 이상의 농도로 처리했을 때, 벼 도열병 원인균인 마그나포르테 오라이제의 균사 생장이 100% 억제되었고 111㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 마그나포르테 오라이제(72.1%), 알터나리아 브라시시콜라(53.4%), 스클레로티니아 스클레로티오럼(40.7%), 콜레토트리쿰 프럭티콜라(37.8%) 순으로 균사생장억제율이 높았으며, 처리농도가 높아짐에 따라 억제율이 증가하였다. 1,000 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 토마토 역병 원인균인 파이토프토라 인페스탄스에 대한 균사생장억제율은 69.3%으로 급증했으나, 푸자리움 옥시스포럼, 보트라이티스 시네리아, 라이족토니아 솔라니에 대한 균사생장억제율은 20.2~35.7%로 낮았고 벼도열병균에 대한 빌레나무 잎·줄기추출물의 균사생장억제 활성이 가장 높았다(표 4 참조).

[0032] 또한, 빌레나무 잎·줄기추출물의 9가지 식물병원성 세균에 대한 세균생장 억제활성을 확인한 결과 빌레나무 잎·줄기추출물의 처리농도가 높아짐에 따라 아그로박테리움 튜메파시엔스의 성장을 52.1%까지 억제하는 효능을 나타내었고 111 ㎍/㎖의 농도로 처리했을 때, 버크홀데리아 글루메의 생장을 40% 억제하는 효능을 나타냈으나, 처리농도가 높아짐에 따른 생장억제활성의 증가는 나타나지 않았다. 1,000㎍/㎖의 농도로 처리했을 때, 펙토박테리움 카로토보럼의 생장을 17.3%까지 저해하는 효능을 나타냈다(표 5 참조).

[0033] 또한, 빌레나무 메탄올추출물 용매 분획의 7가지 식물병에 대한 방제활성을 확인한 결과, 에틸아세테이트분획물과 n-부탄올분획물이 1,000 ㎍/㎖ 농도에서 벼 도열병에 대해 90% 이상의 방제가를 나타냈고, 밀 붉은녹병에 대

해 67%의 방제가를 나타냈다. 하지만 수용액층은 방제활성을 나타내지 않았다. 따라서 빌레나무 추출물의 항균 활성물질은 수용성 물질이 아닌 비극성 물질로 추정되었다(표 6 참조).

[0034] 또한, 빌레나무 메탄올추출물 용매 분획의 벼 도열병균 균사생장 억제 활성을 확인한 결과, 에틸아세테이트분획물과 n-부탄올분획물이 벼 도열병균의 균사생장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 in vitro 조건에서 항균활성을 나타내는 물질이 벼 도열병에 방제 활성을 나타내는 유효성분일 것으로 확인되었다(도 2 참조).

[0035] 따라서, 본 발명의 빌레나무 추출물 및 이의 분획물은 천연물로서 인체에 무해하고 자연계에서 생분해되어 환경부하가 적으면서 벼 도열병(*Magnaporthe oryzae*), 벼 잎집무늬마름병(*Rhizoctonia solani*), 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 토마토 역병(*Phytophthora infestans*), 밀 붉은녹병(*Puccinia recondita*) 및 고추 탄저병(*Colletotrichum coccodes*) 등 식물진균병에 대한 방제활성을 나타내므로 환경친화적인 식물병 방제용 조성물 또는 생물농약으로 개발될 수 있고 고부가가치의 유기농산물 생산에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 계면활성제 및 발효알콜이 추가로 포함될 수 있으며, 추가로 포함되는 계면활성제의 양은 전체 조성물 100 중량부를 기준으로 1 내지 10 중량부, 추가로 포함되는 발효알콜의 양은 전체 조성물 100 중량부를 기준으로 1 내지 20 중량부일 수 있다.

[0037] 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소비탄 라우릴, 소디움도데실 벤젠썰포네이트, 실리콘 폴리에테르 코폴리머 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 특별히 이에 한정되지 않는다. 상기 발효알콜은 통상적으로 사용되는 발효알콜을 의미하며, 바람직하게는 95% 주정일 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물에는 살균효과 강화나 살균범위 확대를 위하여, 살균효과가 알려진 공지의 식물추출물이 더 포함될 수 있다.

[0038] 본 발명은 식물병 방제용 조성물을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병 방제방법을 제공하며, 처리방법은 특별히 한정되지 않고, 예컨대 식물이나 토양에 첨가하는 물이나 비료에 첨가하는 방법 등을 들 수 있다.

[0039] 상기 식물은 바람직하게는 원예식물일 수 있으며, 과채류, 엽채류, 근채류 등을 포함하며, 보다 구체적으로 상기 과채류는 가지, 고추, 딸기, 수박, 오이, 참외, 토마토, 피망, 호박 등을 포함하고, 엽채류는 배추, 부추, 상추, 쌈채소 등을 포함하며, 근채류는 무 등을 포함할 수 있다.

[0040] 상기 식물병 방제용 조성물은 적절한 배율로 희석하여 사용할 수 있으며, 예컨대, 무게 기준으로 500배 이하(예컨대, 10 내지 500배), 바람직하게는 300배 이하 (예컨대 10 내지 300배), 더욱 바람직하게는 200배 이하(예컨대, 10 내지 200배) 의 희석배율로 희석하여 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 방제용 조성물의 희석에 사용되는 희석제는 특별한 제한이 없으며 관련 분야에서 통상적으로 사용되는 희석제를 사용할 수 있으며, 예컨대, 물을 사용할 수 있다.

[0042] 본 발명의 방제방법은 식물 또는 토양에 처리하되, 식물병 방제용 조성물을 식물의 경엽에 3일 내지 5일 간격으로 하여 2 내지 3회 살포하는 것이 바람직하다.

[0043] 본 발명에 따른 식물병 방제용 조성물의 주성분은 식물 이차대사산물로 원칙적인 유기합성살균제의 살포가 불가한 친환경농업에 적합하며, 사람과 가축에 대한 유해성과 잔류독성이 없기 때문에 농산물의 안전성이 보장되므로 원예식물의 수확기 중에도 처리가 가능하다.

[0044] 이들 조성물의 살포 시 식물에 안전하여 유기합성살균제를 대체할 수 있는 안전한 방제물질이다. 또한 화학농약과 혼용 처리하거나 처리 중간에 살포하여도 식물병 방제가 가능하므로 화학농약의 살포횟수 절감에도 크게 기여할 수 있다.

[0045] 본 발명은 식물병 방제용 조성물을 포함하는 식물병 방제제(제품)를 제공한다. 상기 식물병 방제제는 농축물로서 제형화될 수 있으며, 최종 사용자가 적절한 희석배율로 희석시켜 사용할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 방제제는 그 자체로 토양 또는 식물에 처리되고 식물 보호를 제공하는 유동 가능한 제형, 현탁액, 미세 현탁액, 에멀젼(예컨대, 서스포에멀젼, 마이크로에멀젼), 분말 (예컨대, 습윤 가능한 분말), 과립 농축물, 페이스트 등의 형태로 제형화될 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 식물병 방제제는 유효성분으로서 필요에 따라 살충제, 다른 살균제, 제초제, 식물생장조절제, 비료, 광물질 등의 기타 성분을 포함할 수 있다.

[0048] 상기 식물병 방제제는 식물병 방제용 조성물을 유효성분 중량을 기준으로 0.1 내지 99 중량부 바람직하게는 10

내지 90 중량부, 더욱 바람직하게는 50 내지 90 중량부의 양으로 포함할 수 있고, 잔부로서 1종 이상의 계면활성제 및/또는 당해 분야에 공지된 임의의 기타 불활성 성분, 예를 들면, 보호 콜로이드, 접착제, 증점제, 틱소트로픽제, 침투제, 보존제, 안정화제, 소포제, 동결방지제, 금속이온봉쇄제, 염료, 안료, 착색제 및 중합체와 함께 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0049] 상기 침투제로서는, 지방 알코올 알콕시레이트, 광유, 식물유, 광유 혹은 식물유의 에스테르 등을 들 수 있다.

[0050] 상기 안정화제로서는, 에폭시화 동식물유, 비이온계 폴리옥시에틸렌형 계면활성제, 음이온계 폴리옥시에틸렌형 계면활성제, 다가 알코올 및 염기성 물질 등을 들 수 있다.

[0051] 상기 소포제로서는, 상품명 Anti-mousse(BELCHIM CROP PROTECTION제) 등을 들 수 있다.

[0052] 상기 동결 방지제로서는, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등을 들 수 있다.

[0053] 상기 담체로서는, 고체 담체와 액체 담체로 나눌 수 있고, 고체 담체로서는, 전분, 설탕, 셀룰로오스분, 시클로덱스트린, 활성탄, 대두분, 소맥분, 왕겨분, 목분(木粉), 어분(魚粉), 분유 등의 동식물성 분말; 탈크, 카올린, 벤토나이트, 유기 벤토나이트, 탄산칼슘, 황산칼슘, 중탄산나트륨, 제올라이트, 규조토, 화이트카본, 진흙, 알루미나, 실리카, 유황분말, 소석회 등의 광물성 분말 등을 들 수 있다. 또한, 액체 담체로서는, 물; 대두유, 면실유 등의 식물유; 소의 지방, 경유 등의 동물유; 에틸알코올, 에틸렌글리콜 등의 알코올류; 아세톤, 메틸에틸케톤, 메틸이소부틸케톤, 이소포론 등의 케톤류; 디옥산, 테트라히드로푸란 등의 에테르류; 케로신, 등유, 유동파라핀, 시클로헥산 등의 지방족 탄화수소류; 톨루엔, 크실렌, 트리메틸벤젠, 테트라메틸벤젠, 솔벤트 나프타 등의 방향족 탄화수소류; 클로로포름, 클로로벤젠 등의 할로겐화 탄화수소류; N,N-디메틸포름아미드 등의 산아미드류; 초산에틸에스테르, 지방산의 글리세린 등의 에스테르류; 아세트니트릴 등의 니트릴류; 디메틸술폭시드 등의 유황함유 화합물류, 혹은, N-메틸-2-피롤리돈 등을 들 수 있다.

[0054] 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다.

[0055] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

실 시 예 1

[0056] **빌레나무(*Maesa japonica*) 추출물의 7가지 식물병에 대한 방제활성 확인**

[0057] **<1-1> 빌레나무 에탄올 추출물의 제조**

[0058] 본 발명자들은 빌레나무 추출물을 제조하기 위해, 건조한 빌레나무(*Maesa japonica*)의 전초 시료를 잘게 잘라 70% 에탄올 수용액을 가하고 상온에서 24시간 동안 추출하여 여과지로 거른 다음 여과물을 감압농축하여 120 mg의 추출물을 얻었다.

[0059] 하기 빌레나무 추출물의 식물병 방제효과 평가 실험을 위해 60 mg/㎖ 농도로 메탄올에 용해한 식물추출물 시료 2 ㎖를 증류수 38 ㎖로 희석하였고, 전착제 트윈 20(tween 20)을 250 ㎍/㎖ 농도가 되도록 첨가하여 3,000 ㎍/㎖ 농도의 추출물 용액을 40 ㎖ 준비했다. 이때 대조구는 5%의 메탄올과 250 ㎍/㎖의 트윈 20을 함유하는 증류수를 사용하였다.

[0060] **<1-2> 빌레나무 에탄올 추출물의 방제활성 확인**

[0061] 본 발명자들은 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 빌레나무 추출물의 벼 도열병(*Magnaporthe oryzae*), 벼 잎집무늬마름병(*Rhizoctonia solani*), 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 토마토 역병(*Phytophthora infestans*), 보리 흰가루병(*Blumeria graminis f. sp. hordei*), 밀 붉은녹병(*Puccinia recondita*) 및 고추 탄저병(*Colletotrichum coccodes*) 등 7가지 식물병에 대한 in vivo 항균활성을 확인하기 위해 하기와 같이 실험하였다.

[0062] 구체적으로, 각 식물병 당 2개의 포트를 이용하였고, 추출물 용액을 엽면에 분무 살포한 후 24시간 동안 풍건한 다음 각각의 식물 병원균을 접종하였다. 실험에 사용한 벼, 토마토, 보리 및 밀 식물은 지름 4.5 ㎝의 플라스틱 포트에 수도용 상토 또는 원예용 상토를 70% 정도 채운 다음, 종자를 파종하여 25 ± 5℃의 온실에서 1주 내지 4주간 재배하였다.

[0063] 벼 도열병은 3~4 엽기의 유묘에 도열병의 원인균인 마그나포르테 오라이제(*Magnaporthe oryzae*,

한국화학연구원)의 포자 현탁액(5 × 10^5 spores/㎖)을 분무 접종하고, 25℃의 습실상에서 하루 동안 처리한 후, 25℃의 항온실에서 4일간 배양하여 발병을 유도하였다.

[0064] 벼 잎집무늬마름병은 잎집무늬마름병의 원인균인 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*, 한국화학연구원)를 배지(밀기울 90 g, 왕겨 15 g 및 증류수 100 ㎖)에서 7일간 배양하여 얻은 배양물을 5 엽기 유묘에 접종하고 25℃의 습실상에서 4일간 처리한 후, 25℃의 항온실에서 4일간 배양하여 발병을 유도하였다.

[0065] 토마토 역병은 3~4 엽기 토마토 유묘에 역병의 원인균인 파이토프토라 인페스탄스(*Phytophthora infestans*, 강릉대학교)의 유주자낭(10^5 sporangia/㎖)에서 나출된 유주자 현탁액을 분무 접종한 후 25℃의 습실상에서 2일간 처리하고 25℃의 항온항습실에서 1일간 배양하여 발병을 유도하였다.

[0066] 토마토 잿빛곰팡이병은 토마토 3~4 엽기 유묘에 잿빛곰팡이병의 원인균인 보트라이티스 시네리아(*Botrytis cinerea*, 한국화학연구원)의 포자 현탁액(5 × 10^5 spores/㎖)을 처리한 후, 20℃의 습실상에서 3일간 배양하여 발병을 유도하였다.

[0067] 밀 붉은녹병은 1엽기 유묘에 활물기생균으로 알려진 녹병의 원인균인 퍽시니아 리콘디타(*Puccinia recondita*, 인천대학교)의 포자를 250 ㎍/㎖의 트윈 20 용액에 0.67 g spores/ℓ의 양으로 현탁하여 분무 처리하고 20℃의 습실상에서 하루 동안 처리한 후 20℃의 항온실로 옮겨 6일간 배양하여 발병을 유도하였다.

[0068] 보리 흰가루병은 보리의 1 엽기 유묘에 숙주 식물에서 계대배양된 흰가루병의 원인균인 블루메리아 그래미니스 포메 스페살리스 홀데이(*Blumeria graminis f. sp. hordei*, 한국화학연구원)의 포자를 털어서 접종하고 20℃의 항온실에서 7일간 배양하여 발병을 유도하였다. 토마토 잿빛곰팡이병과 토마토 역병은 접종 3일 후, 벼 도열병은 접종 5일 후, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병은 접종 7일 후, 벼 잎집무늬마름병은 접종 8일 후에 병반면적율(%)을 조사하였다.

[0069] 한편, 고추 탄저병에 대한 방제활성 실험을 위해서는, 지름 7.0 ㎝의 플라스틱 포트에 원예용 상토를 70% 정도 채운 다음 최아된 고추 종자를 파종하고, 이를 온실에서 3~4 엽기까지 키운 다음 상기 실시예 <1-1>에서 준비된 빌레나무 추출물 용액을 엽면 살포하였다. 시료 살포 후 24시간 동안 상온에서 건조시킨 다음 고추 탄저병의 원인균인 콜레토트리쿰 코코데스(*Colletotrichum coccodes*, 고려대학교)의 포자 현탁액(4 × 10^5 spores/㎖)을 분무 접종하였다. 25℃의 습실상에서 2일간 습실처리 후에 항온항습실(25℃, 상대습도 80%)에서 1일간 재배하였고, 접종 3일 후에 병반면적율(%)을 조사하였다.

[0070] 상기로부터 얻은 병반면적율(%)을 이용하여 다음과 같은 식에 따라 방제가(%)를 계산하였다.

[0071] [수학식 1]

$$\text{방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{처리구의 병반면적율}}{\text{무처리구의 병반면적율}}\right) \times 100$$

[0072]

[0073] 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이 빌레나무 전초에서 70% 에탄올 수용액으로 수득한 추출물을 3,000 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 보리 흰가루병을 제외한 나머지 6종의 식물병에 대한 방제활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 1 및 도 1). 특히, 벼 도열병, 밀 붉은녹병, 고추 탄저병에 대하여는 방제가 80% 이상의 강한 방제 활성이 나타냈다.

표 1

[0074]

시료	농도 (㎍/㎖)	방제가(%)						
		RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	PAN
빌레나무 전초추출물	3,000	94	55	43	94	100	0	79

RCB: 벼 도열병; RSB; 벼 잎집무늬마름병; TGM: 토마토 잿빛곰팡이병; TLB: 토마토 역병; WLR: 밀 붉은녹병; BPM: 보리 흰가루병; PAN: 고추 탄저병

실 시 예 2

[0075] **빌레나무(*Maesa japonica*) 부위별 추출물의 7가지 식물병에 대한 방제활성 확인**

[0076] **<2-1> 빌레나무 부위별 추출물의 제조**

[0077] 본 발명자들은 빌레나무 잎 및 줄기 건조시료 500 g을 잘게 잘라 10 ℓ의 70% 메탄올 수용액을 가한 후 상온에서 24시간 추출하여 얻은 메탄올 추출물을 여과지를 사용하여 거른 다음, 여과물을 감압농축하여 78.3 g의 잎·줄기추출물을 얻었다.

[0078] 동일한 방식으로 뿌리 건조시료 300 g을 잘게 잘라서 70% 메탄올 수용액 3 ℓ를 가한 후 상온에서 24시간 동안 추출하고 감압농축하여 34.8 g의 뿌리추출물을 얻었다.

[0079] 상기 부위별 추출물을 20 ㎎/㎖ 및 60 ㎎/㎖ 두 가지 농도로 메탄올에 용해시킨 각각의 시료 2 ㎖를 증류수 38 ㎖에 희석하였고, 전착제 트윈 20(tween 20)을 250 ㎍/㎖ 농도가 되도록 첨가하여 1,000 ㎍/㎖ 및 3,000 ㎍/㎖ 농도의 부위별 추출물 용액을 40 ㎖씩 준비했다. 이때 대조구는 5%의 메탄올과 250 ㎍/㎖의 트윈 20을 함유하는 증류수를 사용하였다.

[0080] **<2-2> 빌레나무 부위별 추출물의 방제활성 확인**

[0081] 본 발명자들은 상기 실시예 <2-1>에서 얻은 빌레나무 부위별 추출물의 방제활성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <1-2>에서와 동일한 방법으로 식물병 방제효과를 평가했다.

[0082] 그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이 빌레나무의 잎·줄기추출물 또는 뿌리추출물 용액을 3,000 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 밀 붉은녹병에 대하여 방제가 73% 이상의 높은 방제 효과를 나타냈고, 잎·줄기추출물의 경우 고추 탄저병에 대하여 방제가 50%의 방제활성을 나타내는 것을 확인하였다. 1,000 ㎍/㎖ 농도에서도 두 가지 종류의 추출물은 벼 도열병에 대하여 80% 이상의 높은 방제가를 나타냈고, 벼 잎집무늬마름병균, 밀 붉은녹병에 대해서는 50~60%의 방제가를 나타는 것을 확인하였다(표 2). 빌레나무의 부위별 추출물은 식물병 방제활성에 있어 거의 차이를 나타내지 않았다.

표 2

[0083]

시료	농도 (㎍/㎖)	방제가(%)						
		RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	PAN
빌레나무 잎·줄기추출물	3,000	90	75	14	7	83	0	50
	1,000	87	50	0	0	60	0	20
빌레나무 뿌리추출물	3,000	90	100	14	7	73	0	30
	1,000	80	60	0	7	53	0	20

RCB: 벼 도열병; RSB; 벼 잎집무늬마름병; TGM: 토마토 잿빛곰팡이병; TLB: 토마토 역병; WLR: 밀 붉은녹병; BPM: 보리 흰가루병; PAN: 고추 탄저병

실 시 예 3

[0084] **빌레나무(*Maesa japonica*) 채취시기별 추출물의 7가지 식물병에 대한 방제활성 확인**

[0085] **<3-1> 빌레나무의 채취 시기별 추출물의 제조**

[0086] 본 발명자들은 시기별(1월, 6월, 9월, 12월)로 채취한 빌레나무의 전초를 잘게 잘라 메탄올을 가한 다음 상온에서 24시간 동안 추출하고 여과지를 사용하여 거른 후 여과물을 감압농축하여 건조된 추출물을 얻었다.

[0087] 60 ㎎/㎖ 농도로 메탄올에 용해한 각각의 채취 시기별 빌레나무 전초 시료 2 ㎖를 증류수 38 ㎖로 희석하였고, 전착제 트윈 20(tween 20)을 250 ㎍/㎖ 농도가 되도록 첨가하여 3,000 ㎍/㎖ 농도의 시기별 추출물 용액을 40 ㎖씩 준비했다. 이때 대조구는 5%의 메탄올과 250 ㎍/㎖의 트윈 20을 함유하는 증류수를 사용하였다.

[0088] **<3-2> 빌레나무 채취시기별 추출물의 방제활성 확인**

[0089] 본 발명자들은 상기 실시예 <3-1>에서 얻은 빌레나무 채취시기별 추출물의 방제활성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <1-2>에서와 동일한 방법으로 식물병 방제효과를 평가했다.

[0090] 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이 시기별로 채취한 빌레나무의 전초추출물을 3,000 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 채취시기에 관계없이 벼 도열병에 대하여 방제가 98%의 높은 방제활성을 나타냈다. 9월에 채취한 시료는 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 고추 탄저병에 대하여 방제 활성이 다른 시기와 비교해서 다소 높은 방제

효과를 나타냈다(표 3). 하지만 전체적으로 보았을 때, 채취시기에 따른 식물병 방제효과의 차이는 거의 나타나지 않았다.

표 3

[0091]

시료	채취시기	농도 (㎍/㎖)	방제가(%)						
			RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	PAN
빌레나무 전초추출물	1월	3,000	98	10	44	0	47	0	42
	6월	3,000	98	45	65	0	67	0	33
	9월	3,000	98	45	70	4	58	0	60
	12월	3,000	98	23	61	0	47	0	38
RCB: 벼 도열병; RSB; 벼 잎집무늬마름병; TGM: 토마토 잿빛곰팡이병; TLB: 토마토 역병; WLR: 밀 붉은녹병; BPM: 보리 흰가루병; PAN: 고추 탄저병									

실 시 예 4

[0092] **빌레나무(*Maesa japonica*) 잎·줄기추출물의 8가지 식물병원균에 대한 균사생장 억제활성 확인**

[0093] 본 발명자들은 상기 실시예 <2-1>에서 제조한 빌레나무 잎·줄기추출물을 100 ㎎/㎖의 농도로 메탄올에 용해시킨 시료를 사용하여 식물병원성 곰팡이의 균사생장을 억제하는 효능을 평가하였다.

[0094] 구체적으로, 메탄올에 용해한 잎·줄기추출물을 111, 333, 1,000 ㎍/㎖ 농도로 PDA(감자한천배지, BD Biosciences)에 잘 섞어서 6-웰 플레이트(6-well plate)에 분주하였고, 배지의 정가운데에 3 ㎜ 직경의 곰팡이 균사디스크를 접종하였다. 8종의 곰팡이에 대하여 농도별로 3 반복하여 실험하였다. 보트라이티스 시네리아(*Botrytis cinerea*)와 파이토프토라 인페스탄스(*Phytophthora infestans*)는 20℃에서 배양하였고, 나머지 알터나리아 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 콜레토트리쿰 프럭티콜라(*Colletotrichum fructicola*), 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*), 마그나포르테 오라이제(*Magnaporthe oryzae*), 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 스클레로티니아 스클레로티오럼(*Sclerotinia sclerotiorum*)은 25℃에서 배양하였다. 1% 메탄올을 넣은 감자한천배지에서 배양한 것을 무처리구로 사용했으며, 무처리구의 곰팡이가 웰 직경의 70~80% 정도로 방사생장(radial growth) 했을 때, 무처리구와 처리구의 균사생장직경을 측정했다. 접종한 균사디스크직경 3 ㎜를 뺀 나머지 장경(major axis)과 단경(minor axis)의 길이의 평균값을 사용하여 균사생장직경값을 구했다.

[0095] 상기로부터 얻은 균사생장직경 값을 이용하여 다음과 같은 식에 따라 균사생장억제율(%)을 계산하였다.

[0096] [수학식 2]

$$\text{균사생장억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{처리구의 균사생장직경}}{\text{무처리구의 균사생장직경}}\right) \times 100$$

[0097]

[0098] 그 결과, 표 4에 나타난 바와 같이 빌레나무 잎·줄기추출물을 333 ㎍/㎖ 이상의 농도로 처리했을 때, 벼 도열병 원인균인 마그나포르테 오라이제의 균사 생장이 100% 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 111 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 마그나포르테 오라이제(72.1%), 알터나리아 브라시시콜라(53.4%), 스클레로티니아 스클레로티오럼(40.7%), 콜레토트리쿰 프럭티콜라(37.8%) 순으로 균사생장억제율이 높았고, 처리농도가 높아짐에 따라 억제율이 증가하였다. 1,000 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때, 토마토 역병 원인균인 파이토프토라 인페스탄스에 대한 균사생장억제율은 69.3%으로 급증했으나, 푸자리움 옥시스포럼, 보트라이티스 시네리아, 라이족토니아 솔라니에 대한 균사생장억제율은 20.2~35.7%로 낮았다(표 4). 벼도열병균에 대한 빌레나무 잎·줄기추출물의 균사생장억제활성이 가장 높았고, 이는 상기 <실시예 2>에서 빌레나무 잎·줄기추출물(1,000 ㎍/㎖)이 벼 도열병에 높은 방제가(87%)를 나타내는 것과 일치하는 결과를 나타냈다.

표 4

[0099]

식물병원성 곰팡이	농도 (㎍/㎖)	균사생장억제율(%) ± 표준편차
Magnaporthe oryzae	111	72.1 ± 0.7
	333	100
	1,000	100

Alternaria brassicicola	111	53.4 ± 1.9
	333	58.4 ± 1.4
	1,000	61.4 ± 1.2
Sclerotinia sclerotiorum	111	40.7 ± 0.9
	333	44.5 ± 1.3
	1,000	44.9 ± 2.5
Colletotrichum fructicola	111	37.8 ± 3.7
	333	38.2 ± 1.7
	1,000	46.1 ± 2.2
Phytophthora infestans	111	15.6 ± 1.8
	333	31.3 ± 3.4
	1,000	69.3 ± 3.4
Rhizoctonia solani	111	22.5 ± 0.9
	333	30.8 ± 2.4
	1,000	35.7 ± 1.6
Botrytis cinerea	111	19.4 ± 1.1
	333	21.1 ± 3.7
	1,000	32.2 ± 5.9
Fusarium oxysporum	111	9.8 ± 0.7
	333	13.1 ± 3.0
	1,000	20.2 ± 0.8

실 시 예 5

[0100] **빌레나무(*Maesa japonica*) 잎·줄기추출물의 9가지 식물병원성 세균에 대한 세균생장 억제활성 확인**

[0101] 본 발명자들은 상기 실시예 <2-1>에서 제조한 빌레나무 잎·줄기추출물(100 ㎎/㎖ 농도로 메탄올에 용해시킨 시료)을 사용하여 식물병원성 세균의 생장을 억제하는 활성을 평가하였다.

[0102] 구체적으로, 96-웰 플레이트(96-well plate)에서 액체배지 미량희석법(broth microdilution method)을 사용하였으며, 웰 당 100 ㎕의 TSB(tryptic soybean broth, BD Biosciences) 배지에서 빌레나무 추출물이 최종적으로 111, 333, 1,000 ㎍/㎖ 농도가 되도록 분주하였다. 9종의 식물병원성 세균 엑시도보락스 아베네(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*), 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 버크홀데리아 글루메(*Burkholderia glumae*), 클라비박터 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), 딕케야 크리산테마이(*Dickeya chrysanthemi*), 펙토박테리움 카로토보럼(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), 슈도모나스 시린게(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*), 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*), 잔토모나스 아르보리콜라(*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*)에 대하여 농도별로 3 반복하여 실험하였다. 각 세균은 TSB 배지에서 30℃에서 2일 150 rpm으로 진탕배양 후 TSB 배지로 희석하여 분광광도계로 측정했을 때, OD_{600}(600 ㎚에서 측정한 optical density)값이 0.1이 되도록 하여 세균농도가 약 5.0~8.0 × 10^7 CFU/㎖가 되도록 하였다. 희석한 TSB 세균배양액을 웰 당 1 ㎕씩 접종하여, 최종적으로 약 5.0~8.0 × 10^5 CFU/㎖가 되도록 하였다. 1% 메탄올을 넣은 TSB 배지에서 배양한 것을 무처리구로 사용했으며, 엑시도보락스, 아그로박테리움, 버크홀데리아, 클라비박터, 펙토박테리움은 30℃에서 24시간 정치배양한 후 처리구와 무처리구의 OD_{600}값을 측정하고, 딕케야, 슈도모나스, 랄스토니아, 잔토모나스는 48시간 정치배양 후 OD_{600}값을 측정하였다.

[0103] 상기로부터 얻은 OD_{600} 값을 이용하여 다음과 같은 식에 따라 세균생장억제율(%)을 계산하였다.

[0104] [수학식 3]

$$\text{세균생장억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{처리구의 } OD_{600} \text{ 값}}{\text{무처리구의 } OD_{600} \text{ 값}}\right) \times 100$$

[0105]

[0106] 그 결과, 표 5에서 나타난 바와 같이 빌레나무 잎·줄기추출물의 처리농도가 높아짐에 따라 아그로박테리움 튜메파시엔스의 성장을 52.1%까지 억제하는 효능을 나타내는 것을 확인하였다. 111 ㎍/㎖의 농도로 처리했을 때,

버크홀데리아 글루메의 생장을 40% 억제하는 효능을 나타냈으나, 처리농도가 높아짐에 따른 생장억제활성의 증가는 나타나지 않았다. 또한, 1,000 ㎍/㎖의 농도로 처리했을 때, 펙토박테리움 카로토보럼의 생장을 17.3%까지 저해하는 효능을 나타내는 것을 확인하였다(표 5). 전체적으로 보았을 때, 빌레나무 잎·줄기추출물의 식물병원성 세균에 대한 생장억제활성은 낮았다.

표 5

[0107]

식물병원성 세균	농도 (㎍/㎖)	세균생장억제율(%)
Acidovorax avenae subsp. *cattleyae*	111	0
	333	8.1
	1,000	0
Agrobacterium tumefaciens	111	16
	333	32.5
	1,000	52.1
Burkholderia glumae	111	40
	333	41.1
	1,000	37.9
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*	111	6
	333	0
	1,000	7.6
Dickeya chrysanthemi	111	0
	333	0
	1,000	0
Pectobacterium carotovarum subsp. *carotovarum*	111	4.2
	333	3.8
	1,000	17.3
Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*	111	0
	333	5.1
	1,000	0
Ralstonia solanacearum	111	5.8
	333	0
	1,000	0
Xanthomonas arboricola pv. *pruni*	111	0
	333	0
	1,000	0

실 시 예 6

[0108] **빌레나무(*Maesa japonica*) 메탄올 추출물 용매 분획의 7가지 식물병에 대한 방제활성 확인**

[0109] **<6-1> 빌레나무 메탄올 추출물의 용매 분획물 제조**

[0110] 빌레나무 추출물 항균활성물질의 기초적인 성질을 파악하기 위하여, 상기 실시예 <2-1>에서 제조한 빌레나무 잎·줄기 메탄올추출물의 분획물을 제조하였다.

[0111] 구체적으로, 빌레나무 잎·줄기 메탄올추출물 78.3 g을 3 ℓ의 증류수에 용해시킨 후 동량의 에틸아세테이트 수용액으로 2회 추출한 후 에틸아세테이트층과 수용액층을 감압농축하였다. 농축한 수용액층을 다시 3 ℓ의 증류수로 용해시킨 후 동량의 n-부탄올로 2회씩 추출하였고 유기용매추출물 및 수용액층을 감압농축하여 건조된 용매분획물을 얻었다. 20 ㎎/㎖ 농도로 메탄올에 용해한 각각의 분획물 시료 2 ㎖를 증류수 38 ㎖로 희석하였고, 전착제 트윈 20(tween 20)을 250 ㎍/㎖ 농도가 되도록 첨가하여 1,000 ㎍/㎖ 농도의 분획물 용액을 40 ㎖씩 준비했다. 이때 대조구는 5%의 메탄올과 250㎍/㎖의 트윈 20을 함유하는 증류수를 사용하였다.

[0112] **<6-2> 빌레나무 메탄올 추출물 용매 분획물의 방제활성 확인**

[0113] 본 발명자들은 상기 실시예 <6-1>에서 얻은 빌레나무 메탄올 추출물의 용매 분획물의 방제활성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <1-2>에서와 동일한 방법으로 식물병 방제효과를 평가했다.

[0114] 그 결과, 표 6에 나타난 바와 같이 에틸아세테이트분획물과 n-부탄올분획물이 1,000 ㎍/㎖ 농도에서 벼 도열병

에 대해 90% 이상의 방제가를 나타냈고, 밀 붉은녹병에 대해 67%의 방제가를 나타내는 것을 확인하였다. 그러나, 수용액층은 방제활성을 나타내지 않는 것을 확인하였다(표 6). 따라서 빌레나무 추출물의 항균활성물질은 수용성 물질이 아닌 비극성 물질로 확인되었다.

표 6

[0115]

시료	농도 (㎍/㎖)	방제가(%)						
		RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	PAN
에틸아세테이트층	1,000	90	21	21	8	67	0	25
n-부탄올층	1,000	97	7	7	0	67	0	17
수용액층	1,000	17	0	0	0	0	0	8
RCB: 벼 도열병; RSB; 벼 잎집무늬마름병; TGM: 토마토 잿빛곰팡이병; TLB: 토마토 역병; WLR: 밀 붉은녹병; BPM: 보리 흰가루병; PAN: 고추 탄저병								

실 시 예 7

[0116] **빌레나무(*Maesa japonica*) 메탄올 추출물 용매 분획의 벼 도열병균 균사생장 억제 활성 확인**

[0117] 빌레나무 항균활성물질의 기초적인 성질을 파악하기 위하여, 상기 실시예 <6-1>에서 제조한 에틸아세테이트분획물 및 n-부탄올 분획물의 벼 도열병균에 대한 in vitro 항균활성을 확인하였다.

[0118] 구체적으로, 페이퍼디스크 한천배지확산법(paper disk agar diffusion method)으로 평가하였다. 벼 도열병균 마그나포르테 오라이제의 균사디스크 5개를 삼각플라스크에 담긴 100 ㎖ PDB(감자) 배지에 접종한 후 7~10일 동안 25℃에서 150 rpm으로 진탕한 배양액을 믹서기(blade mixer)로 갈아서 제조한 균사현탁액 중 1 ㎖를 40℃이하로 식힌 100 ㎖ 감자한천배지에 잘 섞어서 굳힌 다음, 에틸아세테이트분획물 및 n-부탄올분획물을 각각 900 ㎍씩 포함한 페이퍼디스크(직경 8 ㎜)를 올려놓고 25℃에서 2일간 배양했다.

[0119] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 에틸아세테이트분획물 및 n-부탄올분획물이 벼 도열병균의 균사생장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 2). 따라서 in vitro 조건에서 항균활성을 나타내는 빌레나무 분획 물질이 벼 도열병에 방제 활성을 나타내는 유효성분일 것으로 확인되었다.

실 시 예 8

[0120] **빌레나무(*Maesa japonica*) 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 용매 분획으로부터 항균활성물질 분리**

[0121] 본 발명자들은 항균활성을 나타내는 빌레나무 분획 물질이 벼 도열병에 방제 활성을 나타내는 유효성분일 것으로 확인하였으며, 따라서 다양한 크로마토그래피 기법을 사용하여 항균활성물질을 분리·정제하는 실험을 수행하였다.

[0122] 구체적으로, 상기 실시예 <6-1>에서 수득한 에틸아세테이트분획물(4.45 g)로부터 항균활성물질을 분리하기 위하여, 실리카겔(silica gel) 액체크로마토그래피 방법을 사용했다. 컬럼(지름 3 ㎝ × 높이 60 ㎝)에 약 300 g 실리카겔을 채우고, 시료를 소량의 다이클로로메탄에 녹여서 로딩한 후에 다이클로로메탄과 메탄올을 99:1, 97:3, 95:5, 70:30의 부피비로 혼합한 용매로 순차적으로 용출시켰다. 박막크로마토그래피(TLC) 패턴에 따라 분획물을 E1~E9로 분리하였다.

[0123] 이 중 분획물 E2(849 ㎎)가 페이퍼디스크 한천배지확산법에서 벼 도열병균에 항균활성을 나타냈다. 따라서, 분획물 E2를 세파덱스 LH-20(Sephadex LH-20, GE Healthcare Life Sciences) 컬럼 크로마토그래피로 다시 분획하고, 이 중 항균활성을 나타내는 분획물 E222241(2.4 ㎎)을 고성능액체크로마토그래피(HPLC)로 분석하였다. 워터스(Waters) 515 HPLC 시스템을 사용하였으며, 컬럼은 페노메넥스(phenomenex)사의 Luna C18(2) (5 ㎛, 4.6 × 250 ㎜)을 사용하였으며, 포토다이오드어레이(photo diode array) 검출기로 210~400 ㎚ 파장의 흡광스펙트럼을 얻었다. 20% 아세토나이트릴수용액에서 80% 아세토나이트릴수용액으로 15분간 선형농도구배(linear gradient)를 주었고, 이후에는 80% 아세토나이트릴수용액로 용출시켰다. 전체분석시간은 30분이고 유속은 1 ㎖/분이었다. 280 ㎚ 파장에서 검출되는 피크(peak)를 분취하여, 벼 도열병에 대한 in vitro 항균활성을 페이퍼디스크 한천배지확산법으로 평가하였다.

[0124] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 15.4분의 체류시간(retention time)를 나타내는 항균활성물질(▼)이 분석되었다(도 3). 이 항균활성물질은 274 ㎚에서 최대흡수파장 값을 나타내는 특징을 가졌다.

실 시 예 9

[0125] **빌레나무(*Maesa japonica*) 메탄올 추출물 n-부탄올 용매 분획으로부터 항균활성물질 분리**

[0126] 본 발명자들은 또한 상기 실시예 <6-1>에서 수득한 n-부탄올분획물(18.71 g)으로부터 항균활성물질을 분리하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0127] 구체적으로, 실리카겔(silica gel) 액체크로마토그래피 방법을 사용했다. 컬럼(지름 6 cm × 높이 60 cm)에 약 500 g의 실리카겔을 채우고, 시료를 소량의 다이클로로메탄에 녹여서 로딩한 후에 다이클로로메탄과 메탄올을 99.5:0.5, 99:1, 95:5, 9:1, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50의 부피비로 혼합한 용매로 순차적으로 용출시켰다. 박막크로마토그래피 패턴에 따라 분획물을 B1~B14로 분리하였고, 이 중 페이퍼디스크 한천배지확산법에서 벼 도열병균에 항균활성을 나타내는 분획물 B9(3,433 mg)을 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피를 통해서 다시 분획하였다. 이로부터 2가지 항균활성 분획물 B944(7.6 mg) 및 B9453(17.0 mg)을 얻었고, 상기 <실시예 8>과 동일한 방법을 사용하여 각각 HPLC로 분석하였다. 210 nm 또는 230 nm 파장에서 검출되는 피크를 분취하여, 벼 도열병에 대한 in vitro 항균활성을 페이퍼디스크 한천배지확산법으로 평가하였다.

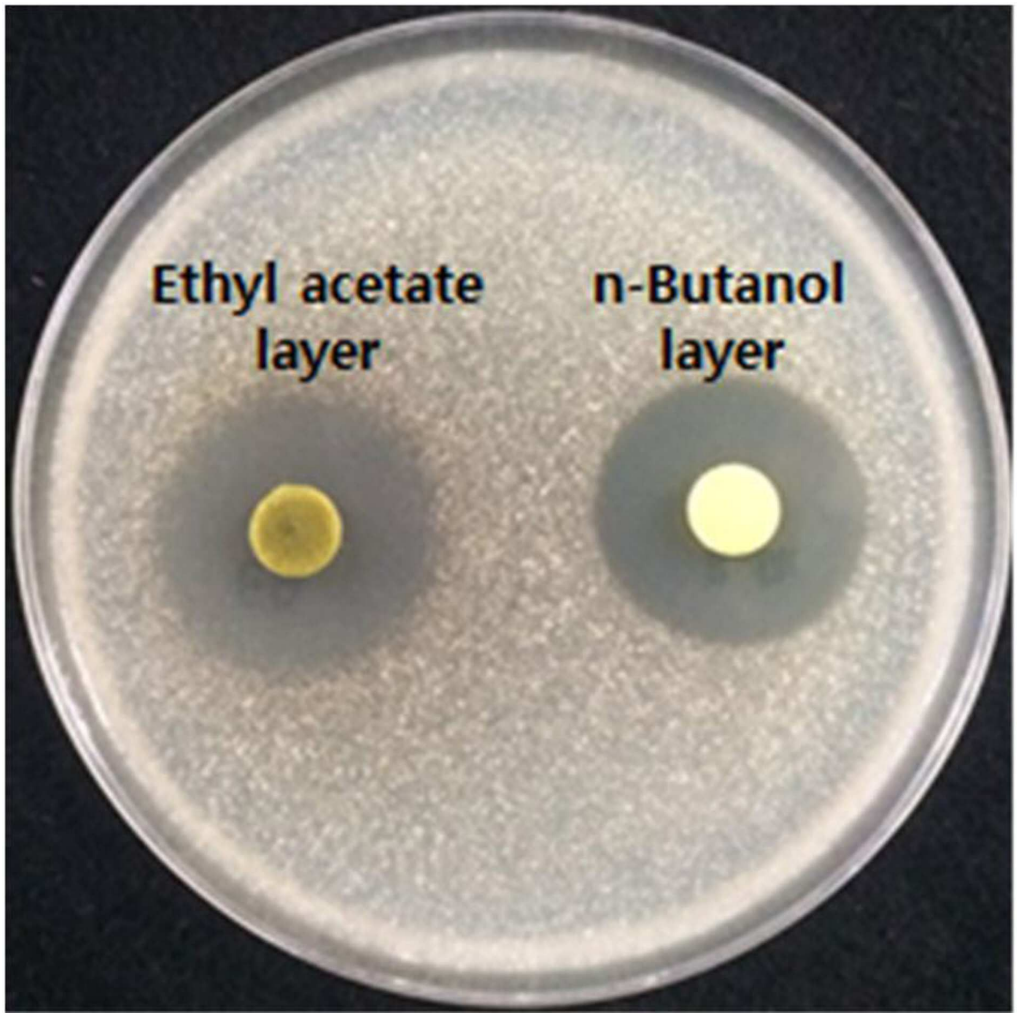
[0128] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 항균활성 분획물 B944(7.6mg)를 HPLC로 분석한 결과 22.2분의 체류시간을 나타내는 항균활성물질(●)이 검출되었으며, 이 물질은 222 nm와 273 nm에서 최대흡수파장 값을 나타내는 특징을 가졌다(도 3). 컬럼에서의 체류시간과 UV 흡광스펙트럼을 바탕으로 상기 <실시예 8>에서 분리된 항균활성물질과는 다른 계열의 화합물일 것으로 추정되었다.

[0129] 또 다른 항균활성 분획물 B9453(17.0 mg)를 HPLC로 분석한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 11.4분(◆)과 11.7분(★)의 체류시간을 나타내는 2가지 항균활성물질이 검출되었다. 2가지 항균활성물질은 216 nm에서 최대흡수파장 값을 나타내는 특징을 보였다(도 5). 컬럼에서의 체류시간과 UV 흡광스펙트럼이 비슷하기 때문에 2가지 항균활성물질은 서로 유사한 화합물일 것으로 추정되었다. 또한 상기 <실시예 8>에서 분리된 항균활성물질 및 상기 도 4의 항균활성물질과는 다른 계열의 화합물임을 알 수 있다.

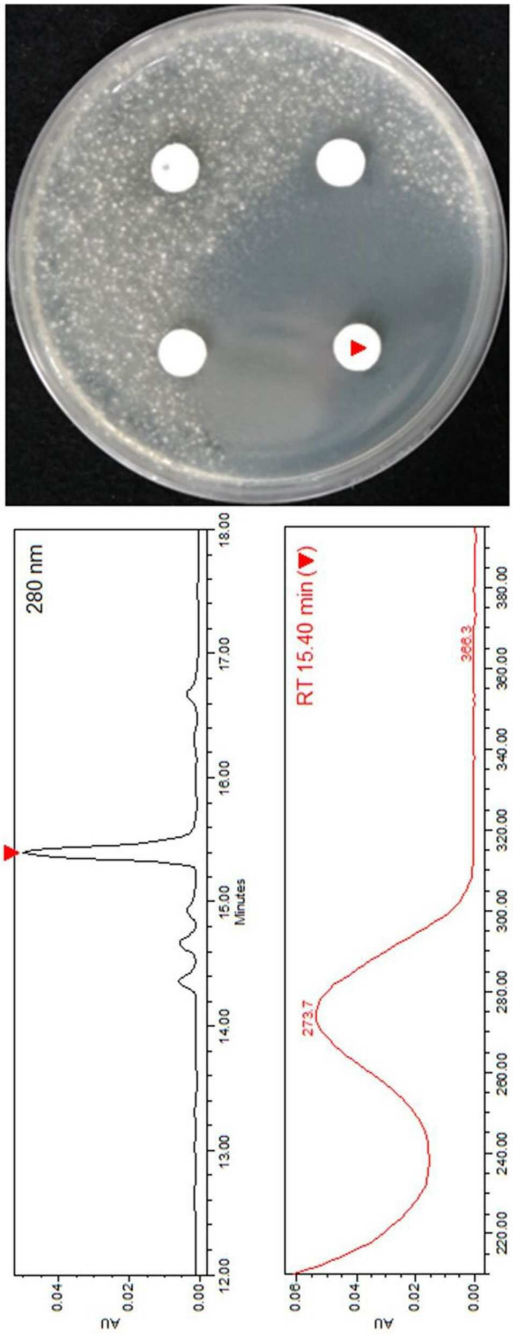
도면

도면1

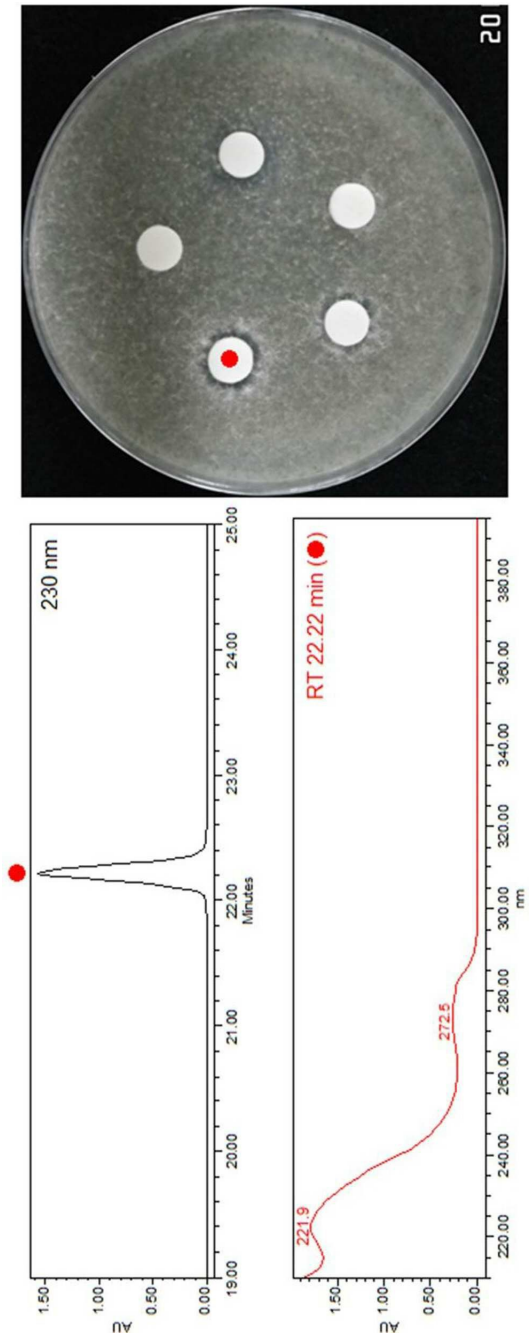
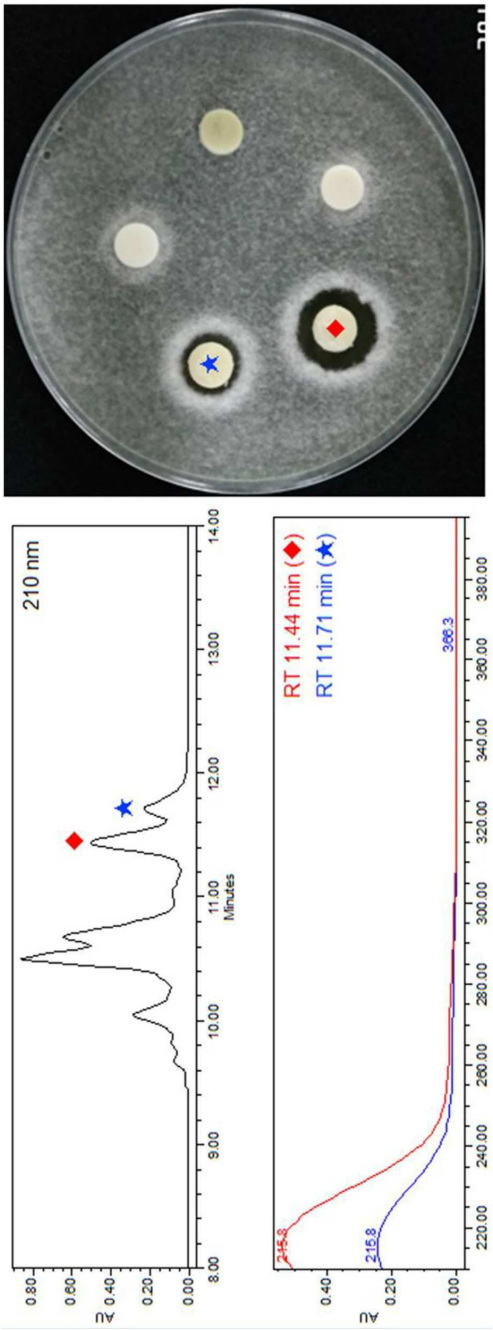
도면2



도면3



도면4



도면5